

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 207—210

Der Einfluß von Vitamin K auf Gerinnungsfaktoren und Enzyme mit kurzer Halbwertszeit in der Rattenleber

Von E. F. VOGELER¹⁾, H. REINAUER und S. HOLLMANN

Institut für physiologische Chemie I der Universität Düsseldorf

(Eingegangen am 29. November 1971)

Ratten wurden durch tägliche Injektionen von Marcumar in einen Vitamin K-Mangelzustand gebracht. In Normal- und Mangeltieren wurde die Aktivität der Gerinnungsfaktoren II und V sowie die Aktivität der Enzyme Tryptophan-Pyrrolase (EC 1.13.1.12), Serin-Dehydratase (EC 4.2.1.13) und Aldolase (EC 4.1.2.13) gemessen. Im Vitamin K-Mangel zeigten die Gerinnungsfaktoren und die Enzyme bis auf die Aldolase einen signifikanten Abfall gegenüber den Kontrolltieren. Injektionen von Menadion an Vitamin K-Mangeltiere ließ die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase und des Prothrombins über den Kontrollwert hinaus ansteigen. Dieser Effekt war sowohl durch Actinomycin D als auch durch Cycloheximid hemmbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine unspezifische Wirkung von Vitamin K auf die Synthese von Enzymen mit kurzer Halbwertszeit abgeleitet. Als Wirkort wird neben der Energiebereitstellung eine unspezifische Beeinflussung der ribosomalen Proteinsynthese diskutiert. Auf die klinische Bedeutung der erhobenen Befunde wird hingewiesen.

The influence of vitamin K on clotting factors and enzymes with short half lives in rat liver

Rats were made vitamin K deficient by daily injections of marcumar. The activities of clotting factors II and V and the activities of the enzymes tryptophan pyrrolase, serine dehydratase and aldolase were measured in normal and deficient animals. In K-deficient animals, the clotting factors and the enzymes, except aldolase, showed a significant decrease compared to control animals. After the injection of menadione into the K-deficient animals, the activities of tryptophan pyrrolase and prothrombin rose above those of the controls. This increase was inhibited by actinomycin D or cycloheximide. These results indicate that vitamin K has a non-specific action on the synthesis of enzymes with short half lives. In addition to its role in energy metabolism, vitamin K appears to influence non-specifically the ribosomal protein synthesis. The clinical importance of these findings is discussed.

In zahlreichen Experimenten wurde festgestellt, daß Gaben von Vitamin K die Aktivität der Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X) im Plasma und in der Leber von Vögeln und Säugetieren erhöhen, bei denen ein Vitamin K-Mangel entweder durch Mangeldiät oder durch Warfarin- oder Dicumarol-Gabe hervorgerufen wurde. Diese Befunde wurden an der isolierten perfundierten Rattenleber bestätigt (1—6). Der aktivierende Einfluß von Vitamin K auf die Prothrombinsynthese im Vitamin K-Mangel konnte mit Hemmstoffen der Proteinsynthese (Äthionin, Actinomycin D, Puromycin, Cycloheximid) unterbunden werden. Aufgrund von früheren Beobachtungen an Vitamin K-Mangel-Hühnern vermutete man den Wirkungsort des Vitamin K bei der Transcription (7, 8). Spätere Untersuchungen schrieben dem Vitamin K eine Kontrollfunktion im Bereich der ribosomalen Proteinsynthese zu (5, 9, 10). Andere Untersucher suchten die Wirkung bei der Ablösung des fertigen Prothrombinmoleküls von der messenger-RNA (4, 11).

Entsprechend den vorliegenden Befunden käme dem Vitamin K eine spezifische Bedeutung für die Prothrombinsynthese zu. Berücksichtigt man die biologische Halbwertszeit der von Vitamin K gesteuerten Gerinnungsfaktoren, so fällt auf, daß die Synthese- und die Abbauraten kurz sind (12—14).

In der vorliegenden Arbeit soll im Tierversuch geklärt werden, ob im Vitamin K-Mangel neben den Gerinnungsfaktoren auch die Aktivitäten von Enzymen mit kurzer Halbwertszeit verändert sind, um auf diese Weise das Wirkungsspektrum und die Spezifität des Vitamins zu erfassen.

Material und Methodik

Reagenzien

Marcumar [3-(1-Phenylpropyl)-4-hydroxycumarin, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach; Faktor II bzw. Faktor V Testbesteck, Behringwerke AG, Marburg; für die Eichkurve der Biuret-Methode wurde Serum-Albumin vom Rind (Behringwerke, Charge A 651) benutzt; Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase/Triosephosphat-Isomerase aus Kaninchenmuskel (EC 1.1.1.8/EC 5.3.1.1) und Lactatdehydrogenase aus Schweineherz (EC 1.1.1.27), Boehringer, Mannheim; Pyridoxal-5-phosphat, Merck AG, Darmstadt; Actinomycin D und Cycloheximid, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg; Menadion [2-Methyl-naphthochinon(1,4)], Merck AG, Darmstadt.

Versuchstiere

Männliche Albino-Ratten vom Stamm Wistar II (Tierzuchterei Brünger, Bokel), Gewicht 250—270 g, bekamen vor der Behandlung Standardfutter (Firma Höveler, Immigrath) und Wasser ad libitum. Für die Dauer der Behandlung wurde jegliches Futter entzogen.

Im Vorversuch wurde die geeignete Dosis von Marcumar ermittelt.

Bei i. p.-Gabe von 500 µg Marcumar/kg Körpergewicht traten bei den Ratten erst nach der vierten Injektion Blutungen der Schleimhäute auf, obwohl der Quickwert schon am zweiten Tag kleiner

¹⁾ Die vorliegende Arbeit enthält wesentliche Teile der Dissertation von E. F. Vogeler.

als 10% war. Die Überlebenszeit betrug nie länger als sechs Tage.

Durchführung der Versuche

Im Hauptversuch wurde ein Teil der Tiere drei Tage lang mit Marcumar (Dosierung: je 500 µg/kg Körpergewicht und Tag) behandelt und am vierten Tage getötet.

Die Kontrolltiere erhielten gleichzeitig mit den Mangeltieren physiol. NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert.

Am vierten Tage wurde sowohl den gespritzten als auch den scheinagespritzten Ratten in einer Äthernarkose durch Aortenpunktion Blut entnommen und gleichzeitig die Leber entfernt. Die Leberproben wurden kurz in physiol. NaCl-Lösung gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aktivitätsmessung erfolgte entweder sofort oder am folgenden Tag. Unterschiede gegenüber sofortigen Bestimmungen konnten nicht festgestellt werden (27). Abweichungen traten erst nach mehrmaligem Auftauen und Einfrieren der Proben auf. Zur Aufarbeitung wurden die Leberproben gewogen, 1:5 (für Aldolase-, Serin-Dehydratase-, Eiweiß-Bestimmung) bzw. 1:7 (für Tryptophan-Pyrrolase-Bestimmung) mit eiskaltem KCl-EDTA-Tris-Puffer (0,15M — 1 mM — 0,1M; pH = 7,6) verdünnt, und zwei Min. lang mit dem POTTER-ELVEHJEM-Homogenisator aufgeschlossen. Die 1:5 Verdünnung wurde in einer präparativen Ultrazentrifuge bei 100000 g 60 Min. lang zentrifugiert. Im Überstand wurde das Gesamteiweiß, die Aktivität der Aldolase und der Serin-Dehydratase gemessen. Die Gerinnungsfaktoren II und V wurden nach dem Einphasenprinzip nach QUICK bestimmt (2). Bei dieser Methode wird dem Citratplasma gleichzeitig mit der Recalcifizierung eine optimale Menge Gewebsthrombokinasen zugegeben. Die resultierende Gerinnungszeit ist dann in weitem Konzentrationsbereich nur von den im zugefügten Plasma enthaltenen Faktoren abhängig, da alle übrigen Faktoren in optimaler Konzentration im Substrat enthalten sind (22).

Das Gesamteiweiß des Leberhomogenats wurde nach der Biuret-Methode bestimmt (23), und die Aldolase nach BRUNS (24). Die Aktivitätsbestimmung der Serin-Dehydratase erfolgte mit unwesentlicher Modifikation nach PROR und PRIES (25, 26), und die der Tryptophan-Pyrrolase nach KNOX und AUERBACH (17).

Ergebnisse

Wirkung von Dicumarol auf Normaltiere

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse von 46 behandelten Ratten zusammengefaßt. Davon erhielten 27 Tiere über drei Tage je 500 µg Marcumar/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert und wurden am vierten Tag getötet. Die restlichen 19 Tiere dienten als Kontrolle und wurde mit physiol. NaCl-Lösung behandelt. Es zeigte sich, daß die Gerinnungsfaktoren II und V innerhalb von vier Tagen stark absanken. So lag bei

Tab. 1
Aktivität der Gerinnungsfaktoren im Blut und der Enzyme in der Leber von Normaltieren und Vitamin K-Mangeltieren (Werte: $\bar{x} \pm s_x$; P)

Enzym	Normal (n = 19)	Vitamin K- Mangel (n = 27)	P
Faktor II (Prothrombin) (%)	99,37 \pm 7,58	3,19 \pm 0,82	<0,001
Faktor V (Accelerin) (%)	99,52 \pm 6,85	62,11 \pm 6,89	<0,001
Tryptophan-Pyrrolase (µMol Kynurenin/g Protein · Std.)	15,12 \pm 1,41	12,63 \pm 1,24	<0,001
Serin-Dehydratase (µMol/g Protein · Std.)	7,11 \pm 1,01	6,28 \pm 0,82	<0,001
Aldolase (µMol/g Protein · Std.)	91,65 \pm 3,54	89,83 \pm 3,35	>0,5

Marcumar-Tieren nach drei Tagen das Prothrombin bei 3% und Faktor V bei 62% der Kontrollen. Auch die Aktivitäten der Tryptophan-Pyrrolase und Serin-Dehydratase zeigten zwar einen geringen aber trotzdem signifikanten Abfall ($P < 0,001$). Dagegen war die Differenz der Aldolase-Aktivität nicht signifikant ($P < 0,5$).

Wirkung von Menadion auf Vitamin K-Mangel-Ratten

24 Marcumar-Vitamin K-Mangelratten und Kontrolltiere erhielten Menadion (100 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Nach jeweils 2, 4, 6, 8 und 10 Stdn. wurden die Tiere getötet, im Blut die Prothrombinzeit und im Leberhomogenat das Gesamteiweiß und die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase bestimmt.

In Tabelle 2 ist die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase und des Prothrombins in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Werten bei Vitamin K-Mangel, so zeigt sich bei der

Tab. 2
Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber und Prothrombin-Aktivität im Blut 2, 4, 6, 8 und 10 Stunden nach Gabe von Menadion an Vitamin K-Mangelratten (Werte: $\bar{x} \pm s_x$; P bezogen auf Vitamin K-Mangeltiere)

Art	Zahl	Tryptophan- Pyrrolase (µMol Kynurenin/g Protein · Std.)	P	Prothrombin (%)	P
Normal	19	15,12 \pm 1,41		99,37 \pm 7,58	
Mangel	27	12,63 \pm 1,24		3,19 \pm 0,82	
2 Stdn.	4	13,38 \pm 2,57	<0,4	9,83 \pm 3,59	<0,001
4 Stdn.	8	23,94 \pm 1,14	<0,001	64,34 \pm 10,48	<0,001
6 Stdn.	4	23,44 \pm 1,89	<0,001	80,75 \pm 9,70	<0,001
8 Stdn.	4	17,08 \pm 6,19	<0,005	100,68 \pm 6,70	<0,001
10 Stdn.	4	24,87 \pm 2,93	<0,001	99,83 \pm 5,26	<0,001

Tryptophan-Pyrrolase nach der zweiten Stunde ein starker Anstieg der Aktivität. Das Maximum wurde nach der vierten Stunde erreicht, betrug das Zweifache des Ausgangswertes und lag sogar fast ein Drittel höher als bei den Normaltieren. Die Differenz der Enzymaktivität war signifikant ($P < 0,001$). Nach der vierten Stunde pendelte die Aktivität um einen Mittelwert herum, der aber immer noch höher lag als die Kontrollwerte.

Beim Prothrombin zeigte sich der größte Anstieg zwischen der zweiten und vierten Stunde, das Maximum (100%) wurde aber erst nach der achten Stunde erreicht.

Zur Prüfung des Einflusses von Menadion auf die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase und des Prothrombins bei Normaltieren, wurden drei scheinagespritzte Ratten mit Menadion behandelt. Die Meßwerte lagen zwar geringfügig höher, waren aber nicht signifikant gegenüber den unbehandelten Normaltieren verändert.

Wirkung von Menadion auf Marcumar-Vitamin K-Mangel-Ratten in Verbindung mit den Hemmstoffen Actinomycin D und Cycloheximid

Marcumar-behandelte Vitamin K-Mangelratten erhielten eine halbe Stunde vor Gabe von Menadion die Inhibitoren Actinomycin D (1 mg/kg Körpergewicht)

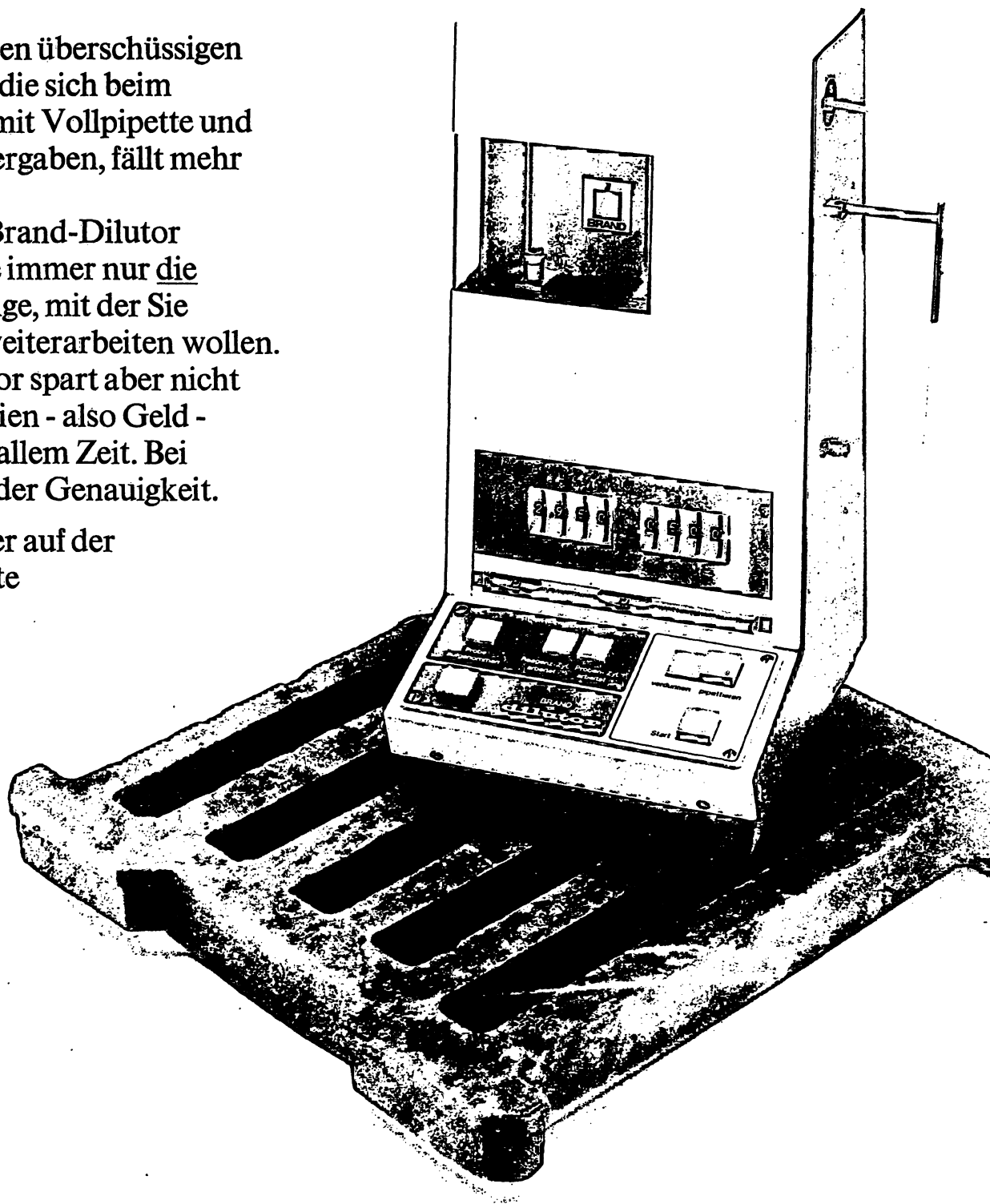
Ihr Ausguß wird ein armer Schlucker

Nichts von den überschüssigen Reagenzien, die sich beim Verdünnen mit Vollpipette und Meßkolben ergaben, fällt mehr für ihn ab.

Denn beim Brand-Dilutor brauchen Sie immer nur die Reagenzmenge, mit der Sie tatsächlich weiterarbeiten wollen.

Dieser Dilutor spart aber nicht nur Reagenzien - also Geld - sondern vor allem Zeit. Bei hervorragender Genauigkeit.

Mehr darüber auf der nächsten Seite



RUDOLF BRAND
LABORGERÄTE UND VAKUUMPUMPEN
698 WERTHEIM/MAIN · POSTFACH 310

BRAND-Dilutor

Volltransistorisiertes Verdünnungs- und Pipettiergerät

Strömungswege, Kolben,
Zylinder und Ventil
bestehen ausschließlich aus
Glas und PTFE

Digitale Volumen-
einstellung

Reagenzzylinder: 1 μ l –
5 000 μ l

Probezylinder: 0,1 μ l –
500 μ l oder: 1 μ l – 5 000 μ l

Zweite Wähltaste ermög-
licht Verwendung als
Dispenser

Universell einsetzbar durch
ausgezeichnete chemische
Resistenz und Anpassung
an den Verwendungszweck

Bedienung durch Druck-
taste oder Fußschalter

Einfache und bequeme
Handhabung

Erstes elektronisch ge-
steuertes Verdünnungs-
gerät

Schnelleinstellung in
Mikroschritten von 0,1 bzw.
1 μ l (rechnerisch 25 000 000
verschiedene Mischungs-
verhältnisse möglich)

Extrem niedriger Einstell-
fehler auch bei geringen
Probevolumina

Nur zwei bewegte Teile an
jedem Zylinder

Außergewöhnlich gute
Reproduzierbarkeit der
Messergebnisse

BRAND-GERÄTE
WEIL DIE
RENTABILITÄT
ENTSCHEIDET



COUPON

Hier konnte Ihnen natürlich nur eine Übersicht über einige wichtige Eigenschaften dieser Geräte gegeben werden. Wenn Sie aber diesen Abschnitt mit einer, notfalls unfrankierten, Postkarte an uns schicken, lassen wir Ihnen gerne weitere Informationen zukommen über:

BRAND-DILUTOR

BRAND Fabrik für Laborgeräte

6980 Wertheim-2

Tab. 3

Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Leber und Prothrombin-Aktivität im Blut vier Stunden nach Gabe von Menadion an Vitamin K-Mangeltiere, die jeweils 30 Min. vor Menadiongabe Actinomycin D bzw. Cycloheximid erhielten (Werte: $\bar{x} \pm s_x$; P bezogen auf Vitamin K-Mangeltiere mit Menadion nach vier Stunden)

Art	Zahl	Tryptophan-Pyrrolase (μ Mol Kynurenin/g Protein · Std.)	P	Prothrombin (%)	P
Mangel + Menadion	8	23,94 \pm 1,14		64,34 \pm 10,48	
Mangel + Actino- mycin + Menadion	8	9,84 \pm 2,09	<0,001	3,36 \pm 1,51	<0,001
Mangel + Cyclo- heximid + Menadion	9	6,75 \pm 0,37	<0,001	2,52 \pm 0,34	<0,001

oder Cycloheximid (10 mg/kg Körpergewicht) intra-peritoneal gespritzt. Nach vier Std. erfolgte die Messung des Gesamteiweißes, der Tryptophan-Pyrrolase und des Prothrombins. Kontrolltiere waren Mangel-tiere, die keine Hemmstoffe erhielten.

In Tabelle 3 werden die Enzymaktivitäten der Vitamin K-Mangeltiere, die 30 Min. vor der Menadionbe-handlung Actinomycin D oder Cycloheximid erhielten, und der Kontrolltiere verglichen. Actinomycin D und Cycloheximid verhinderten den Aktivitätsanstieg der Tryptophan-Pyrrolase und des Prothrombins. Es zeigte sich sogar ein weiterer Abfall: Die Tryptophan-Pyrrolase sank nach Vorbehandlung mit Actinomycin D um etwa 20% und nach Cycloheximid um fast 50% weiter ab. Der Prothrombinspiegel blieb bei Actino-mycin D unverändert niedrig, fiel aber bei Cycloheximid noch um fast ein Drittel ab. Somit läßt sich der Ak-tivitätsanstieg der Tryptophan-Pyrrolase und des Pro-thrombins durch vorgeschaltete Hemmung der Pro-teinsynthese unterbinden.

Höhere Dosen von Cycloheximid (20 mg/kg Körper-gewicht) ergeben zwar einen stärkeren Abfall der En-zymaktivität, waren aber nicht statistisch auszuwerten, da die meisten Tiere schon nach drei bis vier Std. starben. Der QUICK-Wert lag unter 1%.

Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen wurde der Ein-fluß von Vitamin K₃ auf die Aktivität verschiedener Gerinnungsfaktoren im Blut (II, V) und Enzyme in der Leber mit kurzer Halbwertszeit (Tryptophan-Pyrrolase, Serin-Dehydratase) verglichen mit der Aktivität eines Enzyms mit langer Halbwertszeit (Aldolase) (27). Die Halbwertszeit der Faktoren II und V wird mit 1–3 Std. (12–14), der Tryptophan-Pyrrolase mit 2–3 Std. (28–31) und der Serin-Dehydratase mit 4–20 Std. (32) in der Rattenleber angegeben. Das Ziel der Untersuchungen war es zu zeigen, ob unter Vitamin K-Mangel nur die Gerinnungsfaktoren II und V oder auch andere Proteine mit kurzer Halbwertszeit in ihrer Aktivität bzw. in ihrer Synthese vermindert sind. Mit diesen Untersuchungen war zugleich die Frage nach der Spezifität der Wirkung von Vitamin K verbunden.

Die Enzyme Tryptophan-Pyrrolase und Serin-Dehydratase sind adaptative Enzyme (18, 21, 33–35), d. h. ihre Aktivität ist in starkem Maße von der Nahrungs-zufuhr abhängig. Daher wurden die vorliegenden

Untersuchungen ausnahmslos an Hungertieren vor-genommen. Hierdurch war die Streureate der Meßwerte deutlich vermindert.

Der Vitamin K-Mangelzustand, der in dieser Arbeit durch Injektion von Marcumar erzeugt wurde, ist von den alimentären Vitamin K-Mangelzuständen zu unter-scheiden. Es muß daran gedacht werden, daß Mar-cumar durch Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung die Synthese der Proteine allgemein hemmt, was für den alimentären Vitamin K-Mangel in dieser direkten Form nicht zutreffen muß (36–40).

In Marcumar-behandelten Tieren war die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase und Serin-Dehydratase in der Leber parallel mit den Gerinnungsfaktoren II und V im Blut vermindert. Im Gegensatz dazu war der Ak-tivitätsabfall der Aldolase wegen ihrer langen Halb-wertszeit unter unseren Versuchsbedingungen nur gering und nicht signifikant. Diese Befunde können als generelle Hemmung der Proteinsynthese infolge Vita-min K-Mangel gedeutet werden, wobei der Wirkungs-mechanismus und der Wirkungsort nach unklar ist. Zu diskutieren wäre hier eine unspezifische Beein-flussung der Proteinsynthese auf der Höhe der Trans-cription (7, 8), oder am Ribosom bei der Translation (5, 9, 10), bzw. bei der Ablösung des Proteins vom Ribosom (11). Weiterhin wäre eine verminderte Ener-giebereitstellung möglich (41). Eine Stabilisierung von Enzymen und Gerinnungsfaktoren durch Vitamin K ist unwahrscheinlich.

Aufschlußreich sind die Befunde an den Gerinnungs-faktoren und Enzymen nach Vitamin K-Gabe. In-jiziert man Hungertieren Vitamin K₃, so steigt die Ak-tivität der Tryptophan-Pyrrolase nur geringgradig und nicht signifikant an. Verabreicht man aber Vitamin K₃ an Vitamin K-Mangeltiere, so steigt die Aktivität der untersuchten Enzyme über den Kontrollwert hinaus an, wobei maximale Aktivitäten nach etwa vier Std. erreicht werden.

Zur Frage der Ursache des Enzymaktivitätsanstiegs bzw. der Zunahme der Aktivität des Gerinnungs-faktors II wurden Proteinsynthesehemmer (42–44) eingesetzt. Actinomycin D hemmt in einer Konzen-tration von 1 mg/kg Körpergewicht den Anstieg der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität bei Menadiongabe an Vitamin K-Mangeltiere. Der Effekt von Cycloheximid (10 mg/kg Körpergewicht) ist noch ausgeprägter. Bemerkenswert ist, daß sowohl Actinomycin D als auch Cycloheximid den Aktivitätsanstieg verhindern. Somit

läßt sich vermuten, daß der Anstieg der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität und der Aktivität des Gerinnungsfaktors II auf einer de novo Proteinsynthese beruht, wie dies für Prothrombin auf immunologischem Wege bewiesen worden ist (5).

Die Wirkung von Actinomycin D in der verabfolgten Dosis (1 mg/kg Körpergewicht) ist vieldeutig. Da Vitamin K in den Mangeltieren die Aktivität der Gerinnungsfaktoren und Enzyme offenbar unspezifisch steigert und Cycloheximid diesen Aktivitätsanstieg unterbindet, könnte der Wirkort von Vitamin K an den Ribosomen liegen. Untersuchungen des ATP-Gehaltes in der Leber nach Marcumargabe liegen nicht vor. Somit ist zu vermuten, daß entweder die Energie-

bereitstellung oder die Proteinsynthese am Ribosom auf eine unspezifische Weise aktiviert wird.

Das von OLSON und Mitarbeitern (10, 6, 5) postulierte regulatorische Protein hätte demnach eine unspezifische Wirkung auf die ribosomale Proteinsynthese.

Die verminderte Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase und Serin-Dehydratase und der Gerinnungsfaktoren unter Marcumarwirkung hat therapeutische Bedeutung. Unsere Befunde deuten darauf hin, daß bei Patienten mit langer Marcumarbehandlung nicht nur der Prothrombinspiegel vermindert ist, sondern auch Enzyme in ihrer Aktivität verändert und hierdurch nicht beachtete Stoffwechselstörungen, z. B. im Aminosäurestoffwechsel, hervorgerufen werden können.

Literatur

1. DAM, H. und F. SCHÖNHEYDER, *J. Biochem.* 28, 1355 (1934). —
2. QUICK, A. J., *Amer. J. Physiol.* 118, 260 (1937). — 3. MARTII, R., J. L. AMBRUS, J. E. SOKAL und I. MINK, *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 116, 69 (1964). — 4. OLSON, J. P., *J. Clin. Invest.* 45, 690 (1966). — 5. LI, L. F., R. K. KIPFER und R. E. OLSON, *Arch. Biochem. Biophysics* 137, 494 (1970). — 6. OLSON, R. E., R. K. KIPFER und L. F. LI, *Adv. Enzym. Reg.* 7, 83 (1969). — 7. OLSON, R. E., *Science* 145, 926 (1964). — 8. OLSON, R. E., *Canad. J. Biochem.* 43, 1565 (1965). — 9. JOHNSON, B. C., R. B. HILL, R. ALDEN und G. S. RANHOTRA, *Life Sci.* 5, 385 (1966). — 10. OLSON, R. E., G. R. PHILIPPS und N. T. WANG, *Adv. Enzym. Reg.* 6, 213 (1968). — 11. HILL, R. B., S. GAETANI, A. M. PAOLUCCI, P. B. RAMA-RAO, R. ALDEN, G. S. RANHOTRA, D. V. SHAH, V. K. SHAH und B. C. JOHNSON, *J. biol. Chemistry* 243, 3930 (1968). — 12. WRIGHT, I. S., F. KOLLER und F. STREULI, *Thromb. Diathes. Haemorrh. Suppl.* 4, 101 (1960). — 13. HARPER, P. V., E. CALVARY und J. G. ALLEN, *Fed. Proc.* 15, 87 (1956). — 14. STEFANINI, M. und V. A. PISCIOTTA, *Science* 111, 364 (1950). — 15. GESCHWIND, I. I. und C. H. LI, *Nature* 172, 732 (1953). — 16. GESCHWIND, I. I. und C. H. LI, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 14, 789 (1954). — 17. KNOX, W. E. und V. H. AUERBACH, *J. biol. Chemistry* 214, 307 (1955). — 18. KNOX, W. E., *Brit. J. exper. Path.* 32, 462 (1951). — 19. FALLON, H. J., E. J. HACKNEY und W. L. BYRNE, *J. biol. Chemistry* 241, 4157 (1966). — 20. DREWS, J., *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 126, 671 (1967). — 21. FEIGELSON, P. und O. GREENGARD, *Adv. Enzym. Reg.* 7, 119 (1968). — 22. HARTERT, H. und G. LEUBE, *Diagnostik* 3, 242 (1970). — 23. KINGSLEY, G. R., *J. biol. Chemistry* 131, 197 (1939). — 24. BRUNS, F. H. und H. U. BERGMAYER, in H. U. Bergmeyer: *Methoden der enzymat.*
- Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. S. 724 (1962). —
25. PITOT, H. C. und N. PRIES, *Analytic. Biochem.* 9, 454 (1964). —
26. PERIANO, C., *J. biol. Chemistry* 242, 3860 (1967). — 27. SCHAPIRA, G., J. KRUH, J. C. DREYFUS und F. SCHAPIRA, *J. biol. Chemistry* 235, 1738 (1960). — 28. SCHIMKE, R. T., E. W. SWEENEY und C. M. BERLIN, *J. biol. Chemistry* 240, 322 (1965). — 29. KNOX, W. E. und M. M. PIRAS, *J. biol. Chemistry* 242, 2959 (1967). — 30. CHO-CHUNG, Y. S. und H. C. PITOT, *Europ. J. Biochem.* 3, 401 (1968). — 31. LABRI, F. und A. KORNER, *J. biol. Chemistry* 243, 1116 (1968). — 32. JOST, J. P., E. A. KHAIRALLAH und H. C. PITOT, *J. biol. Chemistry* 243, 3057 (1968). — 33. KNOX, W. E. und A. H. MEHLER, *Science* 113, 237 (1951). — 34. WOOD, J. S. und W. E. KNOX, *Proc. Amer. Ass. Canc. Res.* 45th Meet. 1, 52 (1954). — 35. CAFFERY, J. M., L. WICHARD und J. L. IRVIN, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 157, 616 (1968). — 36. MARTIUS, C. und D. NITZ-LITZOW, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 12, 134 (1953). — 37. MARTIUS, C. und D. NITZ-LITZOW, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 13, 152 (1954). — 38. MARTIUS, C. und D. NITZ-LITZOW, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 13, 288 (1954). — 39. PARMAR, S. S. und J. LÖWENTHAL, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 8, 107 (1962). — 40. BERRY, D., E. BERRY und R. E. OLSON, *Fed. Proc.* 25, 542 (1966). — 41. MARTIUS, C., *Dtsch. med. Wschr.* 83, 1701 (1958). — 42. TRAKATELLIS, A. C., A. E. AXELROD und M. MONTJAR, *Nature* 203, 1134 (1964). — 43. WETTSTEIN, F. O., H. NOLL und S. PENMAN, *Biochim. biophysica Acta*, Amsterdam 87, 525. — 44. COLOMBO, B., L. FELICETTI und C. BAGLIONI, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 18, 389 (1965).

Priv.-Doz. Dr. H. Reinauer
4000 Düsseldorf 1
Witzelstr. 111